

REGENERASI EMBRIOSOMATIK TENKAWANG (*SHOREA STENOPTERA* BURCK) PADA BEBERAPA KONSENTRASI ZAT PENGATUR TUMBUH GA3 DAN BAP

*(Somatic Embryos Regeneration of Tengkawang (Shorea stenoptera Burck.)
at Various Concentrations of Plant Growth Regulator GA3 and BAP)*

Neliyati

Fakultas Pertanian, Universitas Jambi, Mendalo Darat, Jambi

email: neliyati.sigan@yahoo.com

ABSTRACT

This research was aimed to identify the effect of various type and concentration of plant growth regulators for induce callus embryo somatic regeneration from Tengkawang plantlets. The type of plant growth regulators are GA3 and BAP and the concentration of GA3 are 0.1, 0.5 and 1.0 ppm and BAP are 1.0, 3.0, 5.0 ppm. The result of this experiment showed all treatment could induced the regeneration of callus somatic embryos to form a new root organs but failure to induced shoot formation. The highest percentage of root formation was achieved at plant growth regulator BAP 3.0 ppm. Culture which failure to regenerate the new organ, still induced callus with compact structure and at GA3 treatment the colour. Was dominant with sulfur colour and brown at BAP treatment.

Key word: Tengkawang , growth regulator, regeneration

PENDAHULUAN

Shorea stenoptera Burck. merupakan jenis pohon dari famili *dipterocarpaceae* yang dikenal sebagai tengkawang tungkul atau biasa disebut meranti merah yang menghasilkan biji tengkawang. Biji tengkawang menghasilkan minyak nabati yang dalam dunia industri digunakan sebagai bahan pengganti lemak coklat, bahan farmasi dan kosmetik. Selain menghasilkan biji, famili *dipterocarpaceae* juga menghasilkan kayu yang bernilai ekonomi. Tengkawang jenis ini banyak tumbuh di tanah aluvial di hutan hujan tropis dan wilayah dataran rendah sekitar 600 meter di atas permukaan laut. Habitat pohon tengkawang berupa hutan hujan tropis dataran rendah menyebabkan keberadaan jenis ini di alam menurun drastis, karena hutan hujan tropis dataran rendah merupakan tipe ekosistem hutan yang mengalami degradasi dan deforestasi besar-besaran akibat kegiatan *illegal logging* dan konversi lahan menjadi perkebunan, hutan tanaman industri, dan pertambangan. Menurut data dari IUCN (*International Union for The Conservation of Nature and Natural Resources*) versi 2010, *Shorea stenoptera* Burck. termasuk kategori *Endangered* (EN) (genting atau terancam) yang artinya status konservasi yang diberikan kepada spesies yang sedang menghadapi risiko kepunahan di alam liar yang tinggi pada waktu yang akan datang.

Berdasarkan keputusan Menteri Kehutanan dan Perkebunan No. 692/KPTS-II/1998 dan Peraturan Pemerintah No.7 Tahun 1999 menegaskan bahwa tengkawang adalah pohon langka dan dilindungi.

Perbanyakan tengkawang dapat dilakukan secara generatif dan vegetatif. Namun cara perbanyakan tersebut mempunyai beberapa kelemahan sehingga ketersediaan bibit tengkawang sangat terbatas. Secara generatif keterbatasan utama disebabkan oleh musim berbunga dan berbuah tidak terjadi setiap tahun tetapi bervariasi tiap 4 - 5 tahun, bahkan ada yang 13 tahun baru berbuah lebat. Kedua, buah yang dihasilkan tidak dapat disimpan lama karena bersifat rekalsitran dan teknik penyimpanannya belum dikuasai, sementara itu daya kecambahnya menurun dengan cepat (Yasman dan Smits, 1988).

Mengingat sulitnya mendapatkan bibit tengkawang secara konvensional maka perlu dilakukan terobosan dengan menerapkan teknologi perbanyakan tanaman yang cepat dan dalam waktu yang singkat agar didapat bibit tengkawang yang berkualitas tinggi sehingga kebutuhan bibit tengkawang dapat terpenuhi dan plasma nutfah tengkawang dapat diselamatkan dari kepunahan. Alternatif yang dapat digunakan adalah dengan menggunakan teknik kultur jaringan.

Perbanyakan dengan teknik kultur jaringan dapat dilakukan melalui embriogenesis somatik. Embriogenesis somatik adalah suatu proses berkembangnya sel somatik menjadi tanaman tanpa melalui fusi gamet, maksudnya bukan zigot tetapi berasal dari sel tubuh tanaman (Gunawan 1992). Keuntungan dari proses regenerasi embrio somatik (embriogenesis) dibandingkan dengan regenerasi tunas (organogenesis) antara lain kecepatan multiplikasi embrio somatik lebih tinggi dan proses embrio somatik dapat dipertahankan dalam jangka waktu yang lama sehingga tidak tergantung pada sumber eksplan. Raemaker *et al* (1995), melaporkan proses embrio genesis dapat dipertahankan dalam waktu relatif lama melalui pembentukan kalus embriogenik.

Embriogenesis mempunyai beberapa tahap spesifik, yaitu (1) induksi sel dan kalus embriogenik, (2) pendewasaan, (3) perkecambahan, dan (4) hardening. Pada tahap induksi kalus embriogenik dilakukan isolasi eksplan dan penanaman pada media tumbuh. Untuk induksi kalus embriogenik kultur umumnya ditumbuhkan pada media yang mengandung auksin yang mempunyai daya aktivitas kuat atau dengan konsentrasi tinggi. Dari berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa 2,4-D dan pikloram merupakan auksin yang efektif untuk induksi kalus embriogenik. Zat pengatur tumbuh tersebut merupakan auksin sintesis yang cukup kuat dan tahan terhadap degradasi karena reaksi enzimatik dan fotooksidasi. Di samping auksin, sering pula diberikan sitokinin seperti benzil adenin (BA) atau kinetin secara bersamaan (Bhojwani dan Razdan, 1989). Tahap pendewasaan adalah tahap perkembangan dari struktur globular membentuk kotiledon dan primordia akar. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa tahap pendewasaan adalah tahap yang paling sulit. Pada tahap ini sering digunakan auksin pada konsentrasi rendah. Tahap perkecambahan adalah fase di mana embrio somatik membentuk tunas dan akar. Pada media perkecambahan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan sangat rendah atau bahkan tidak diberikan sama sekali. Tahap hardening, yaitu tahap aklimatisasi bibit embrio somatik dari kondisi *in*

vitro ke lingkungan baru di rumah kaca dengan penurunan kelembaban dan peningkatan intensitas cahaya.

Sampai saat ini, penelitian mengenai kultur jaringan teng-kawang masih sangat terbatas. Hasil penelitian Scott *et al.* (1987) yang mengkulturkan embrio *Shorea roxburghii* G. Don. Dapat membentuk tunas pada media MS yang mengandung BAP 5 mgL⁻¹. Akar terbentuk dari tunas tersebut dengan penambahan zat pengatur tumbuh NAA dan IBA masing-masing 0.1 mgL⁻¹. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang dapat meregenerasikan/mengecambahkan kalus embriosomatik tanaman tengkawang menjadi tanaman lengkap yang mempunyai tunas dan akar (planlet)

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Jambi. Dilaksanakan pada bulan Februari sampai November 2012 Bahan tanaman yang digunakan adalah daun muda (umur 30-35 hari) dari bibit *Shorea stenoptera* Burck. Bahan kimia komposisi media WPM, sukrosa, bakto agar, 2,4-D, pikloram, BAP, GA3, asam amino prolin, bahan sterilan (agrept, benlox, clorox, alkohol 96%).

Penelitian ini dilakukan dengan 3 tahapan, yaitu (1) Pembentukan kalus (2) Induksi embriosomatik dan (3) regenerasi embriosomatik. Pelaksanaan penelitian dapat dilihat pada Gambar 1.

Tahap 1. Pembentukan kalus

Seluruh alat yang digunakan harus disterilkan. Botol kultur dicuci dengan deterjen dan bilas hingga bersih, setelah itu direndam dengan bayclin 5 ml/l air selama 1 malam. Alat penanaman seperti pinset, pisau scalpel dan cawan petri terlebih dahulu dibungkus dengan kertas lalu disterilisasi bersama dengan botol kultur dalam autoclave pada tekanan 1 atmosfer dengan suhu 121°C selama 30 menit. Setelah disterilisasi, alat tersebut diovenkan pada suhu 75°C sampai saat digunakan. LAFC dan rak kultur disemprot terlebih dahulu dengan alkohol 70% setiap akan digunakan. Ruang inkubasi juga disterilkan dengan alkohol 70% 2 hari sebelum digunakan.

Media yang digunakan untuk induksi kalus adalah media WPM + 3 ppm pikloram + 1 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP. Media dipadatkan dengan penambahan 7 g/l agar bakto dan 30 g sukrosa. Medium diatur pH-nya menjadi sekitar 5,8 kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 25 menit dengan suhu 121°C menggunakan tekanan 1 atmosfer. Selanjutnya eksplan daun yang sudah disterilkan dipotong dengan ukuran 1-1,5 cm ditanam pada media tersebut dan dikultur sampai umur 12 minggu. Selanjutnya kalus disubkultur ke media embriosomatik yaitu media WPM + 25 µM asam amino prolin.

selama 12 minggu. Selanjutnya disubkultur ke media regenerasi sesuai perlakuan. Tahapan/langkah kegiatan ditampilkan pada Gambar 1.

Tahap II. Induksi embriosomatik

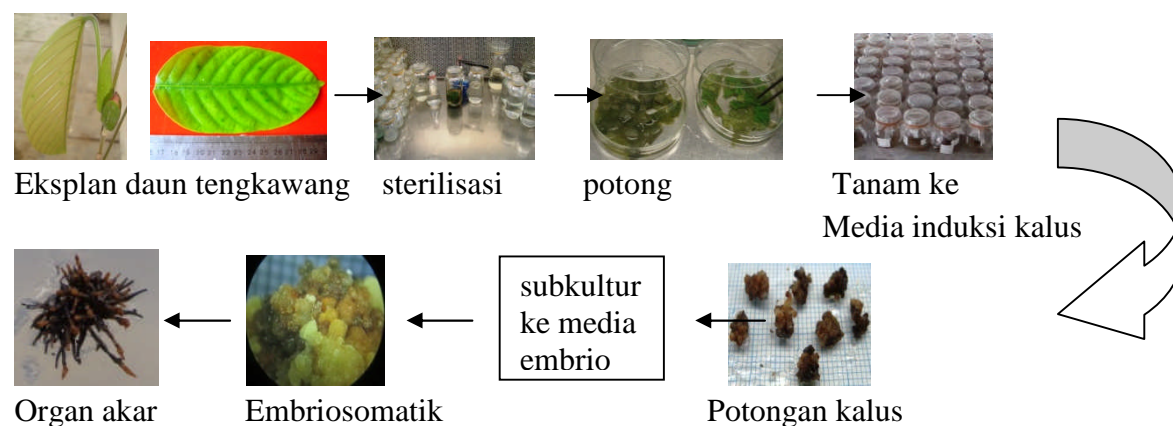
Kalus yang dihasilkan dari tahap I yang berumur 12-14 minggu setelah tanam dipotong dengan ukuran $\pm 4-6$ mm selanjutnya disubkultur pada media embriosomatik yaitu media WPM + 25 μ M asam amino prolin (tahap II) sampai 12 minggu.

Tahap III. Regenerasi embriosomatik

Kalus embriosomatik disubkultur ke media regenerasi, yaitu :

- WPM + 25 μ M aa prolin
- WPM + 0,1 ppm GA3
- WPM + 0,5 ppm GA3
- WPM + 1,0 ppm GA3
- WPM + 1,0 ppm BAP
- WPM + 3,0 ppm BAP
- WPM + 5,0 ppm BAP

Setiap perlakuan terdiri atas 9 botol kultur, setiap botol kultur terdapat satu unit kalus embriosomatik berukuran ± 5 mm. Pengamatan dilakukan terhadap perkembangan embriosomatik apakah terbentuk tunas (shootlet), akar (rootlet), tunas dan akar (planlet) atau menjadi kalus. Kondisi lingkungan di mana kultur dipelihara memiliki suhu $25 \pm 1^\circ\text{C}$, lama pencahayaan adalah 16 jam per hari yang diperoleh dari lampu fluorescence dengan intensitas $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Data yang dihasilkan diolah secara diskriptif, tabulasi dan rata-rata, ditampilkan dalam bentuk tabel dan foto.



Gambar 1. Prosedur pelaksanaan regenerasi embriosomatik tanaman tengkawang (*Shorea stenoptera* Burck) menggunakan eksplan daun.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan pada kultur yang berasal dari media embriosomatik (WPM + 25 μ M asam amino prolin) disubkultur pada media WPM yang ditambah zat pengatur tumbuh GA 3 dan BAP pada semua konsentrasi secara tunggal beregenerasi membentuk akar (rootlet)

dan begitu pula kultur yang disubkultur ke media yang sama pada saat induksi embriosomatik yaitu media WPM + 25 μ M asam amino prolin juga beregenerasi membentuk akar. Regenerasi kultur membentuk akar mulai terlihat 4 minggu setelah sub kultur. Sampai 16 minggu setelah sub kultur. Persentase kultur yang membentuk akar terbanyak terjadi pada perlakuan media WPM + BAP 3 ppm yaitu 77,78 % dan persentase pembentukan akar terkecil dari perlakuan WPM + 0,5 ppm GA3 yaitu 33,33%. Persentase kultur membentuk akar pada semua perlakuan ditampilkan pada Tabel 1 dan Gambar 2.

Tabel 1. Persentase kultur membentuk akar berdasarkan perlakuan

Perlakuan	Persentase kultur berakar	Jumlah kultur
WPM + 25 μ M aa Prolin	55,56	5/9
WPM + 0,1 ppm GA3	66,67	6/9
WPM + 0,5 ppm GA3	33,33	3/9
WPM + 1,0 ppm GA3	44,44	4/9
WPM + 1,0 ppm BAP	66,67	6/9
WPM + 3,0 ppm BAP	77,78	7/9
WPM + 5,0 ppm BAP	66,67	6/9

Terjadinya regenerasi kultur membentuk akar pada semua perlakuan diduga oleh adanya respon embriosomatik terhadap pemberian GA3 dan BAP. GA3 merupakan zat pengatur tumbuh yang secara fisiologis berfungsi memecahkan dormansi embrio untuk berkecambah. Menurut Wattimena (1988) salah satu efek fisiologi GA3 adalah mendorong aktivitas enzim hidrolitik dalam proses perkecambahan biji. GA3 dalam medium dapat memacu perkecambahan melalui perannya dalam pemecahan pati oleh enzim amilase serta mengaktifkan auksin pada ujung batang. Demikian juga dengan sitokinin pada kondisi tertentu dapat menggantikan peranan asam giberelik pada proses perkecambahan. Hasil penelitian Oktavia *et al.* (2003) pada kultur jaringan kopi arabika embriosomatik yang berasal dari eksplan daun, hipokotil, kotiledon dan akar mampu berkecambah menjadi planlet pada media dasar MS dengan penambahan GA3. Embriosomatik yang berkecambah dengan persentase tertinggi diperoleh dengan penambahan GA3 5 μ M. Semakin tinggi konsentrasi GA3 persentase embriosomatik yang berkecambah semakin menurun.

Disamping itu terjadinya regenerasi embriosomatik menjadi akar dan tidak beregenerasi membentuk tunas (shootlet) pada tanaman tengkawang ini diduga adanya habituasi auksin yang disebabkan oleh pengaruh auksin pada saat induksi kalus yang menggunakan auksin ganda yaitu 3 ppm pikloram dan 1 ppm 2,4-D dan adanya auksin endogen. Hal ini dibuktikan dengan tetap terbentuknya akar pada embriosomatik yang disubkultur pada media yang sama dengan induksi embriosomatik yaitu media WPM + 25 μ M asam amino prolin atau tanpa penambahan GA3 maupun BAP. Dengan dominannya pertumbuhan akar diduga dapat menyebabkan tertekannya pembentukan tunas pada embrio tersebut sehingga penambahan sitokinin (BAP) sampai konsentrasi 5 ppm pada penelitian ini belum mampu mengubah perbandingan auksin dan sitokinin dalam embrio untuk dapat memacu pembentukan tunas. Sitokinin BAP dan GA3 lebih berperan kepada pembelahan

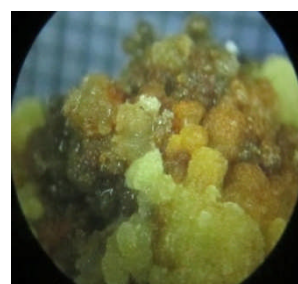
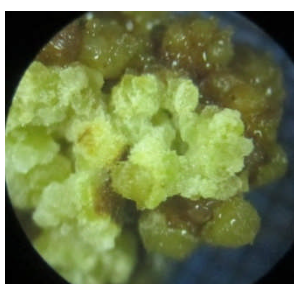
dan pemanjangan sel pada organ akar sehingga pembentukan dan pemanjangan akar pada media WPM yang ditambah GA3 dan BAP lebih cepat. George dan Sherrington (1984) menyatakan bahwa pembelahan sel akan terhambat apabila kadar sitokinin dalam medium kultur tidak memadai.

Menurut Laslo and Vicas (2008), keseimbangan zat pengatur tumbuh endogen terhadap eksogen sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Pierik (1997) juga telah menyatakan, bahwa pada umumnya auksin berperan meningkatkan pemanjangan sel, pembelahan sel, dan pembentukan akar adventif. Senyawa ini juga menghambat pembentukan tunas adventif dan tunas aksilar, namun dibutuhkan untuk induksi embriogenesis pada kultur suspensi sel. Hasil penelitian Oktavia *et al.* (2003) pada kultur jaringan kopi arabika peningkatan auksin 2,4-D dari 1 μM menjadi 5 μM pembentukan embriosomatik berkurang dan pembentukan kalus lebih banyak dan dari kalus tersebut terbentuk akar adventif.

Kultur yang tidak beregenerasi membentuk akar ataupun tunas terus berkembang membentuk kalus kembali dengan struktur kompak dan warna menjadi lebih dominan kuning-hijau terutama pada perlakuan media yang mengandung GA3, sedangkan pada media yang ditambahkan BAP kalus masih mengarah kepada kalus embriogenik dengan warna lebih dominan coklat (Tabel 2.). Penampilan kultur pada setiap perlakuan disajikan pada Gambar 2, 3, 4 dan 5.

Tabel 2. Pengaruh perlakuan terhadap warna dan struktur kalus

Perlakuan	Warna Kalus Dominan	Struktur Kalus
WPM + 25 μM aa Prolin	Kuning coklat	Kompak
WPM + 0,1 ppm GA3	Kuning-hijau	Kompak
WPM + 0,5 ppm GA3	Kuning-hijau	Kompak
WPM + 1,0 ppm GA3	Kuning-hijau	Kompak
WPM + 1,0 ppm BAP	Kuning-coklat	Kompak
WPM + 3,0 ppm BAP	Kuning-coklat	Kompak
WPM + 5,0 ppm BAP	Kuning-coklat	Kompak



Gambar 2. Kultur umur 12 minggu pada media embriosomatik (WPM + 25 μM aa prolin) dan disubkultur pada media regenerasi setelah 14 minggu.



BAP 1 ppm

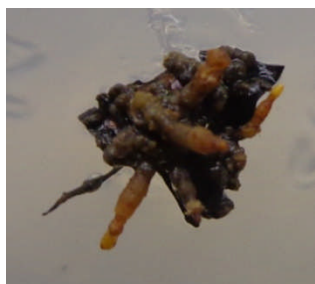


BAP 3 ppm



25 µM aa Prolin

Gambar 3. Contoh kultur yang beregenerasi membentuk akar pada media yang ditambah BAP dan aa.prolin



GA3 0,1 ppm



GA3 0,5 ppm



GA3 1 ppm

Gambar 4. Contoh kultur yang beregenerasi membentuk akar pada media yang ditambah GA3



GA3 1,0 ppm



BAP 1 ppm



GA3 0,5

Gambar 5. Contoh kultur yang belum beregenerasi membentuk organ

KESIMPULAN

1. Semua perlakuan yang dicobakan dapat meregenerasikan embriosomatik yang berasal dari eksplan daun muda tanaman tengkawang (*Shorea stenoptera* Burck.) membentuk organ akar.
2. Regenerasi membentuk akar terbanyak diperoleh dari perlakuan media WPM yang ditambah zat pengatur tumbuh BAP 3 ppm yaitu 77,78 %
3. Semua perlakuan yang dicobakan belum mampu meregenerasikan kultur menjadi tunas dan planlet.

4. Kultur yang tidak beregenerasi membentuk akar, tunas ataupun planlet tetap tumbuh membentuk kalus dengan struktur dominan kompak dan warna kuning, hijau dan coklat.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan jenis zat pengatur tumbuh yang lain yaitu jenis zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin dengan beberapa konsentrasi maupun dengan menggunakan jenis asam amino yang lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kemeterian Pendidikan Nasional melalui Penelitian Hibah Bersaing lanjutan sesuai dengan surat perjanjian pelaksanaan penelitian Hibah Bersaing Lanjutan Nomor: 10/UN21.6/PL/2012 tanggal 15 Februari 2012 yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhojwani, S.S., dan M.K., Rhazdan. 1989. *Plant Tissue Culture. Theory and Practice*. Develop. In Crop Science 5. Elsevier. Tokyo. 562p.
- George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics. Ltd. England.
- Gunawan L. W. 1992. *Teknik kultur jaringan tumbuhan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. 165hal.
- Laslo,V. Dan S. Vicas. 2008. *The Influence of certain phytohormones on organogenesis process for in vitro culture of apricot (Armeniaca vulgaris)*. Analele Universitatii Oradea, Fascicula: Protectia Mediului 13: 200-2005.
- Oktavia, F., Siswanto., A. Budiani., dan Sodarsono. 2003. *Embriogenesis somatik langsung dan regenerasi planlet kopi arabika (Coffea arabica) dari berbagai eksplan*. Menara Perkebunan, 2003, 71(2), 44-55.
- Pierik. R.L.M. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publ. Netherlands. 344p

- Raemakers C.J.J.M., E. Jacobsen., R.G.F.Visser. 1995. *Secondary Somatic Embryogenesis and Application in Plant Breeding*. Euphytica 81:93-107.
- Scott. E.S., C.S. Loh dan A.N. Rao. (1987). *Production of Plantlets of Shorea roxburghii* G. Don. from Embryonic Axes Cultured *In Vitro*.
- Wattimena, G. A. (1988). *Zat pengatur tumbuh tanaman*. Bogor, Pusat Antar Universitas IPB.
- Yasman,I dan W.T.M.Smits, 1988. *Metode Pembuatan Stek Dipterocarpaceae*. Balai Penelitian Kehutanan. Samarinda.